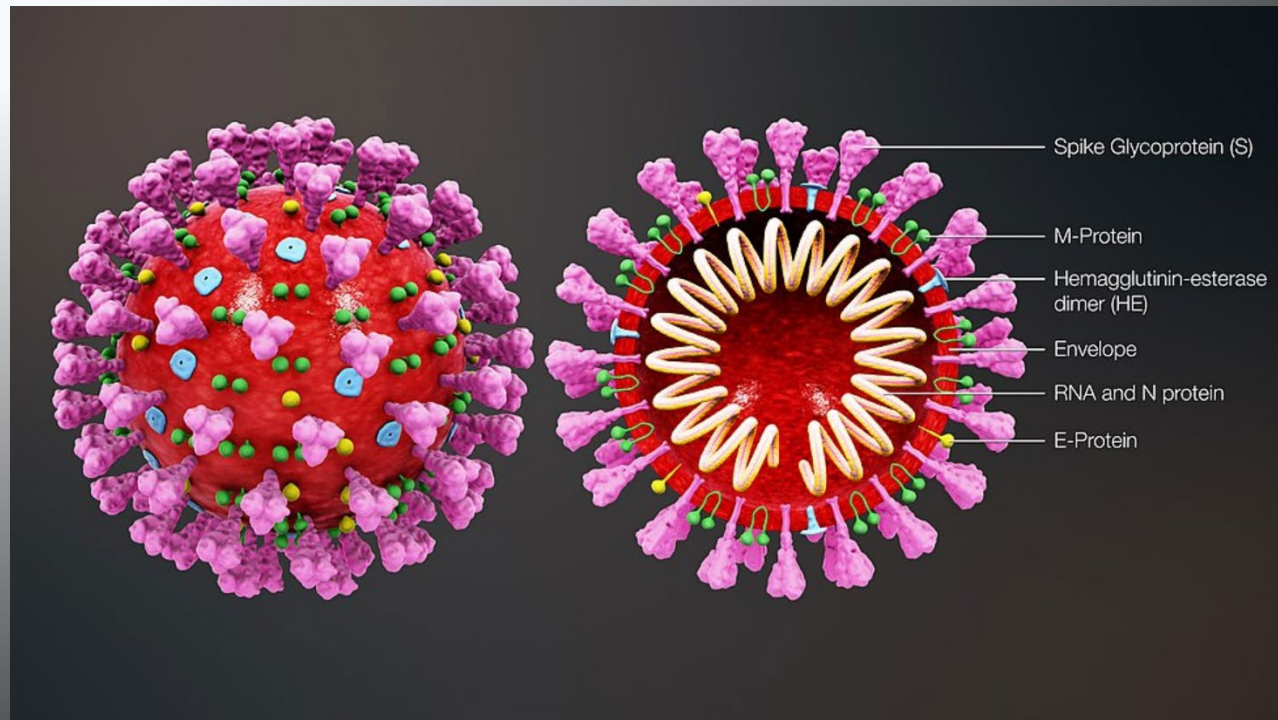


Analýza RNA viru SARS-CoV-2 na Biofyzikálním ústavu AV ČR, v.v.i. Metodika kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR)



https://commons.wikimedia.org/wiki/File:3D_medical_animation_coronavirus_structure.jpg

Možnosti nabízené klinickým pracovištím, nikoliv soukromým osobám:

- 1) Příjem 160 vzorků RNA denně
- 2) Přepis RNA do cDNA a následná qPCR reakce na přístrojích typu Quantstudio 5 (Applied termocykler (qPCR pro 96 vzorků v jednom běhu).

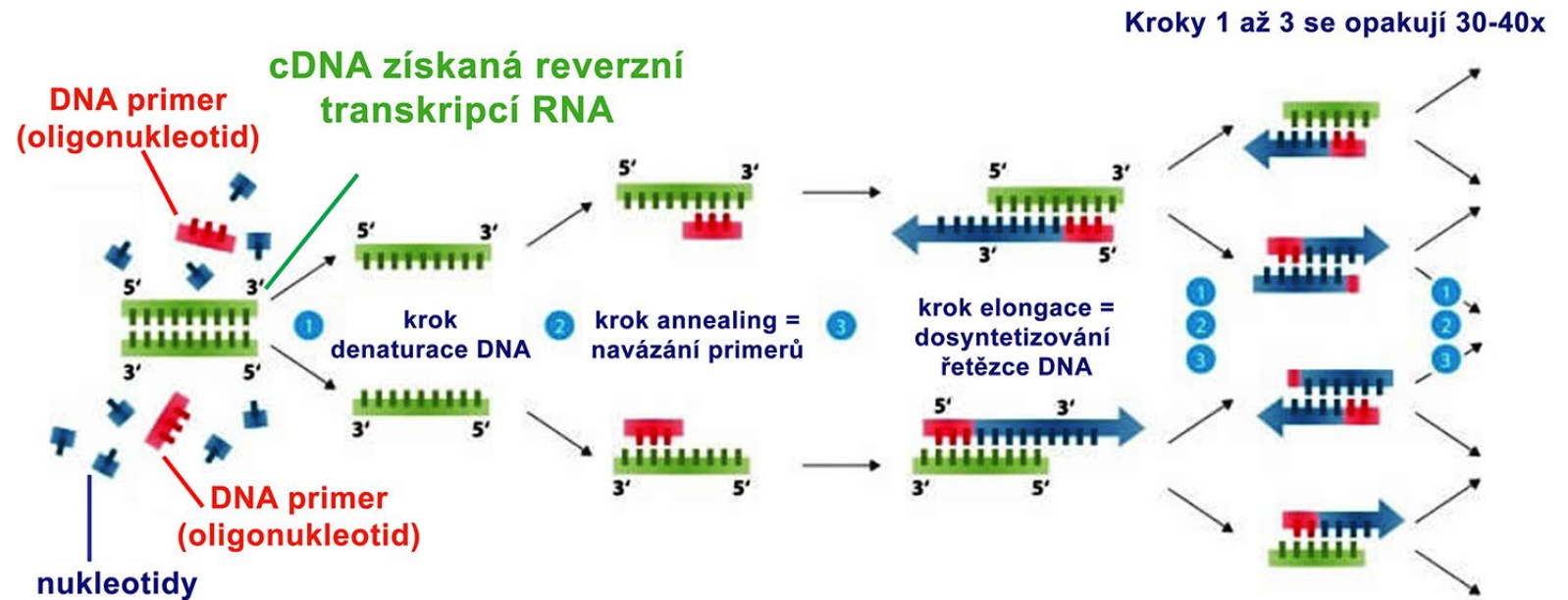
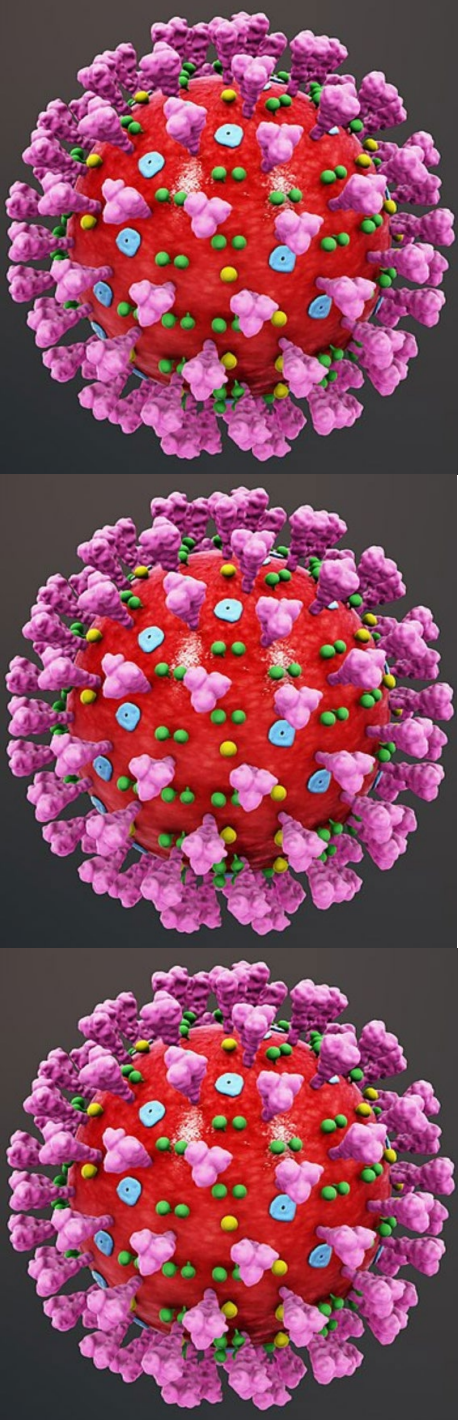
Počty možných vyšetřených vzorků: 160 / den

Může pomoci testovat 4-5 dobrovolníků (Ph.D. studenti a vědci).

Infekční materiál musí odebrat, zpracovat a dodat kliniky, které za pomoci automatických robotických nástrojů izolují virovou RNA.

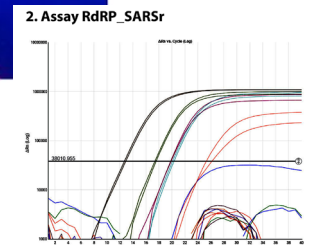
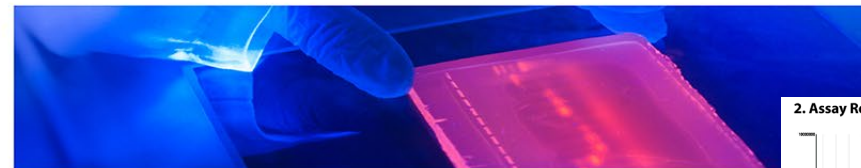
Na BFÚ jsme schopni provádět testy u již neinfekční RNA, izolované z viru SARS-CoV-2.

Princip kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR)



- 1 Denaturation at 94-96°C
- 2 Annealing at ~68°C
- 3 Elongation at ca. 72 °C

Kroky 1 až 3 se opakují 30-40x na PCR cyklu.
Výsledkem je (pozitivita) nebo není (např. nepřítomnost viru) PCR produkt



Testování přítomnosti SARS-CoV-2

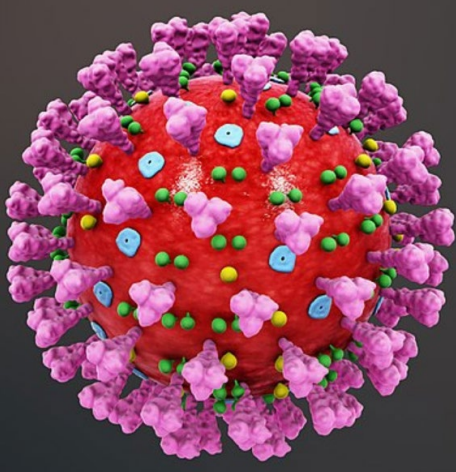
Biofyzikální ústav, AV ČR, v.v.i.

1. RNA na testování získána z nemocnice, metoda izolace RNA nebyla optimalizována
2. Optimalizace detekce přítomnosti SARS-CoV-2 pomocí primerů a metodiky získané z **Generi Biotech s.r.o.**
3. Nejedná se o CE IVD kity
4. Jedná se o assaye pro cílové sekvence dle protokolu Charité (Berlín) modifikované dle současného použití ve Fakultní nemocnici Hradec Králové + ověřený OneStep RT-qPCR MasterMix s interní pozitivní kontrolou.
5. Testy s těmito komponentami jsou v současné době prováděny v laboratořích Fakultní nemocnice Hradec Králové pro detekci SARS-CoV-2, kde je využívána detekce virového E genu a pozitivní výsledek potvrzen RdRP genem podle sekvencí protokolu Charité Berlín.

PCR primery

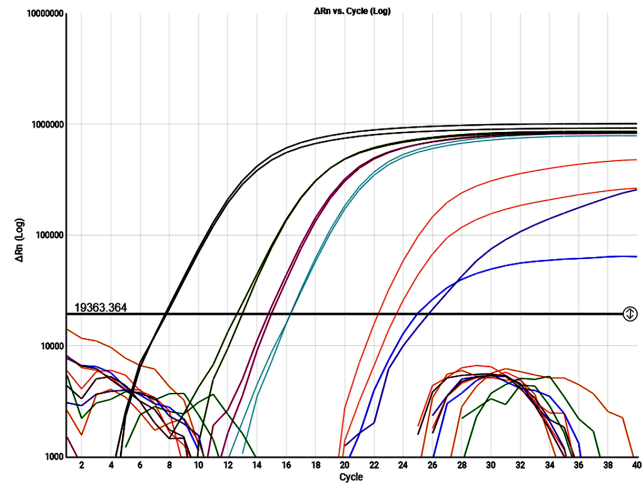
název	sekvence	koncentrace v PCR
RdRP_SARsr-F2	GTGARATGGTCATGTG TGGCGG	400 nM
RdRP_SARsr-R1	CARATGTTAAASACAC TATTAGCATA	400 nM
RdRP_SARsr-P2	FAM- CAGGTGGAACCTCATC AGGAGATGC-BHQ1	200 nM

název	sekvence	koncentrace v PCR
E_Sarbeco_F1	ACAGGTACGTTAATA GTTAATAGCGT	400 nM
E_Sarbeco_R2	ATATTGCAGCAGTAC GCACACA	400 nM
E_Sarbeco_P1	FAM- ACACTAGCCATCCTT ACTGCGCTTCG- BHQ1	200 nM

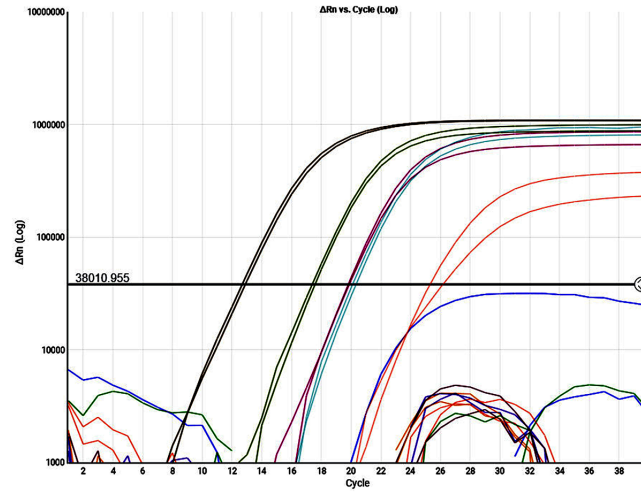


Metodika qPCR – SARS-CoV-2 optimalizovaná na Biofyzikálním ústavu

1. Assay E_Sarbeco



2. Assay RdRP_SARSr



vzorky pozitivní na virovou RNA

vzorky negativní: bez přítomnosti virové RNA

Metodiku optimalizovala:
Dr. Denisa Komůrková ve spolupráci s
Dr. Alešem Kovaříkem.

Příprava OneStep RT-PCR MasterMixu:

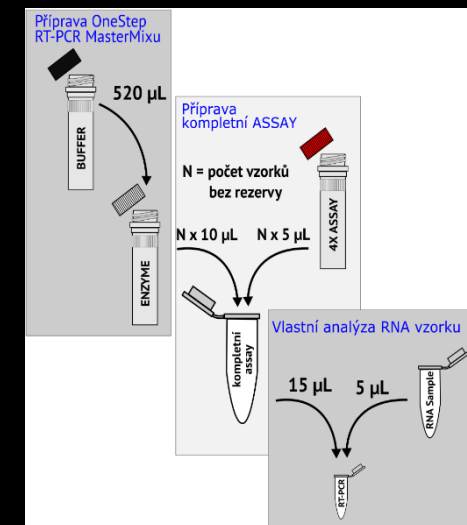
A: Buffer (520 μ l) přidat do zkumavky s enzymem (reverzní transkriptáza)

B: Příprava kompletní assay:

	E_Sarbeco	RdRP_SARSr
Master-mix (10 μ l) (gb OneStep IPC Elite RT-qPCR kit)		
4xAssay (5 μ l)		
RNA (5 μ l)		

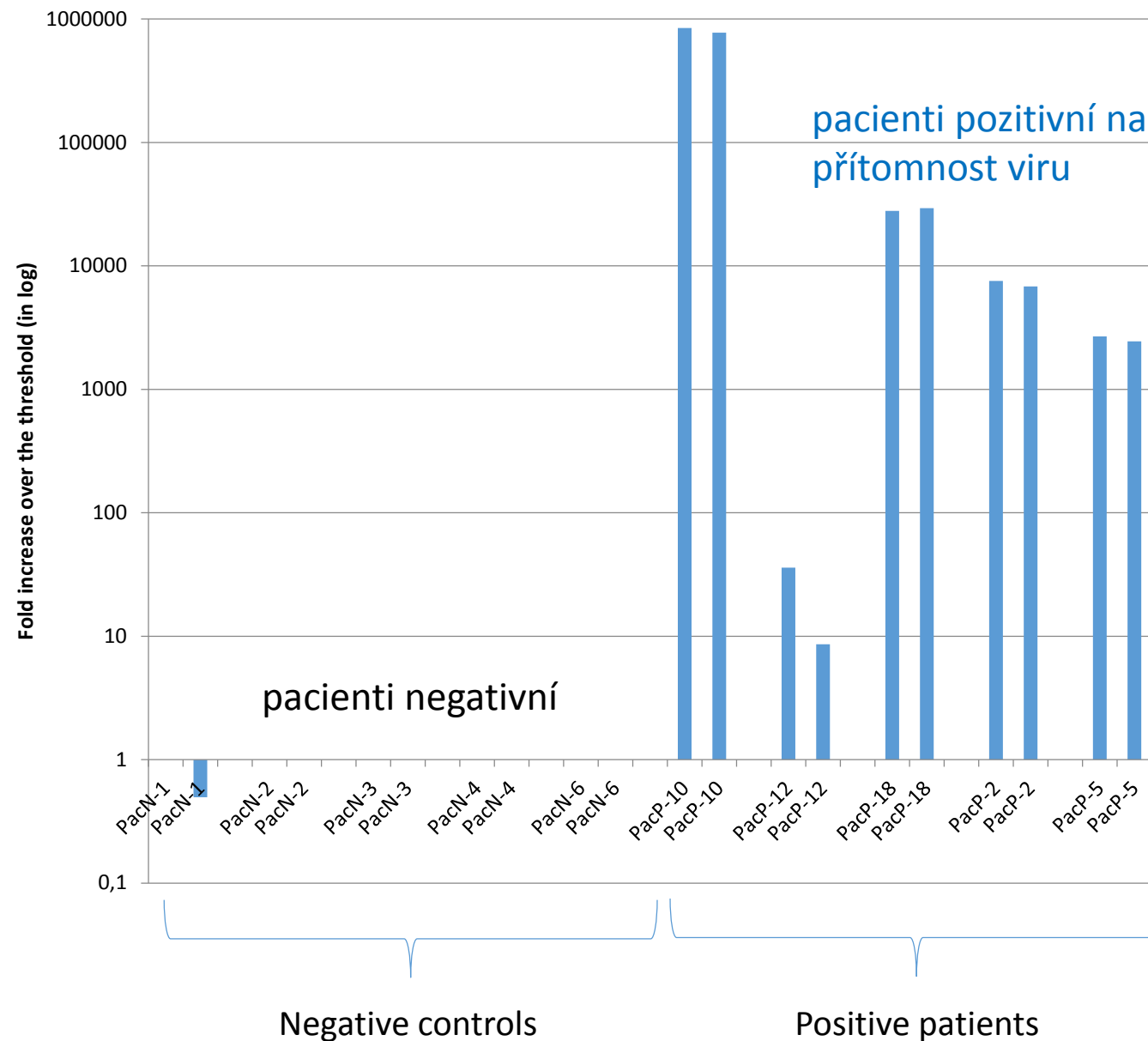
PCR cykly: QuantStudio 5 (Applied Biosystems)

- 1) RT: 42°C/30 min
- 2) 95°C/3min
- 3) Preamplifikace: 12 cyklů: 95°C/10s, 60°C/25s
- 4) 95°C/3 min
- 5) Amplifikace: 40 cyklů: 95°C/10 sec, 60°C/25s



SARS-CoV-2 test

Samples from 23. 3. Generi kit, E_SAR primers, Exp. 29.3.2020



Data

Sample	Fold increase
PacN-1	0
PacN-1	0.496595407
PacN-2	0
PacN-2	0
PacN-3	0
PacN-3	0
PacN-4	0
PacN-4	0
PacN-6	0
PacN-6	0
PacP-10	847 816.638
PacP-10	774 157.862
PacP-12	35.852
PacP-12	8.611
PacP-18	27 848.301
PacP-18	29 389.298
PacP-2	7 544.743
PacP-2	6 804.939
PacP-5	2 688.226
PacP-5	2 446.604

**Výsledky zpracoval: Dr. Aleš Kovařík
Dr. Denisa Komůrková**